

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-235598

(43)Date of publication of application : 26.08.2003

(51)Int.Cl.

C12P 21/00

C12N 15/09

(21)Application number : 2002-355906

(71)Applicant : RENGO CO LTD

(22)Date of filing : 06.12.2002

(72)Inventor : HIGASHIDE SHOKEN
EZURE TORU
SHIRAKI SATOKO
ITO MASAAKI

(30)Priority

Priority number : 2001375822 Priority date : 10.12.2001 Priority country : JP

**(54) EXTRACT FOR PROTEIN SYNTHESIS BY CELL-FREE SYSTEM, METHOD FOR
SYNTHESIZING PROTEIN BY CELL-FREE SYSTEM BY USING THE SAME, AND METHOD FOR
PREPARING THE EXTRACT**

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an easily prepared new extract for protein synthesis by a cell-free system, and enabling the protein synthesis by the cell-free system by which a glycoprotein can also be synthesized, to be achieved, and to provide a method for preparing the extract, and a method for the protein synthesis by the cell-free system by using the extract.

SOLUTION: The extract for the protein synthesis by the cell-free system contains at least an extract derived from a silkworm tissue, and an extraneous mRNA. The method for protein synthesis by the cell-free system uses the extract. The method for preparing the extract for the protein synthesis by the cell-free system involves adding the extraneous mRNA to the extract derived from the silkworm tissue and extracted from the silkworm tissue by using a liquid for extraction.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 05.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of

BEST AVAILABLE COPY

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-235598

(P2003-235598A)

(43)公開日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51)Int.Cl.⁷

C 12 P 21/00
C 12 N 15/09

識別記号

F I

マークコード(参考)

C 12 P 21/00
C 12 N 15/09

A 4 B 0 2 4
A 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全16頁)

(21)出願番号 特願2002-355906(P2002-355906)
(22)出願日 平成14年12月6日 (2002.12.6)
(31)優先権主張番号 特願2001-375822(P2001-375822)
(32)優先日 平成13年12月10日 (2001.12.10)
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000115980
レンゴー株式会社
大阪府大阪市福島区大開4丁目1番186号
(72)発明者 東出 将賢
大阪府大阪市福島区大開4-1-186 レ
ンゴー株式会社中央研究所内
(72)発明者 江連 徹
大阪府大阪市福島区大開4-1-186 レ
ンゴー株式会社中央研究所内
(74)代理人 100080791
弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 無細胞系タンパク質合成用抽出液、およびそれを用いた無細胞系タンパク質合成方法、ならびに
該抽出液の調製方法

(57)【要約】

【課題】 調製が容易であり、糖タンパク質の合成も可能な無細胞系タンパク質合成を実現し得る新規な無細胞系タンパク質合成用抽出液、およびその調製方法、ならびに当該抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成方法を提供する。

【解決手段】 カイコ組織由来の抽出物と、外来mRNAとを少なくとも含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液、およびそれを用いた無細胞系タンパク質合成方法、ならびに、カイコ組織から抽出用液を用いて抽出したカイコ組織由来の抽出物に、外来mRNAを添加する無細胞系タンパク質合成用抽出液の調製方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カイコ組織由来の抽出物と、外来mRNAとを少なくとも含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液。

【請求項2】 さらに、プロテアーゼインヒビターを含有する請求項1に記載の抽出液。

【請求項3】 カイコ組織由来の抽出物の含有量が、タンパク質濃度で1mg/mL～200mg/mLである、請求項1または2に記載の抽出液。

【請求項4】 カイコ組織が、カイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する請求項1～3のいずれかに記載の抽出液。

【請求項5】 カイコ組織が、カイコ幼虫の脂肪体を少なくとも含有する請求項1～3のいずれかに記載の抽出液。

【請求項6】 カイコ組織が、カイコの胚を少なくとも含有する請求項1～3のいずれかに記載の抽出液。

【請求項7】 プロテアーゼインヒビターがフェニルメタンスルホニルフルオリドである、請求項2～6のいずれかに記載の抽出液。

【請求項8】 カイコ組織由来の抽出物と、プロテアーゼインヒビターとを少なくとも含有することを特徴とする無細胞系タンパク質合成用液状組成物。

【請求項9】 請求項1～7のいずれかに記載の抽出液を使用した無細胞系タンパク質合成方法。

【請求項10】 カイコ組織から抽出用液を用いて抽出したカイコ組織由来の抽出物に、外来mRNAを添加することを特徴とする、無細胞系タンパク質合成用抽出液の調製方法。

【請求項11】 抽出用液がプロテアーゼインヒビターを少なくとも含有するものである請求項10に記載の調製方法。

【請求項12】 カイコ組織から抽出用液を用いて抽出したカイコ組織由来の抽出物に、液状フィブロインを除去する処理を施すことを特徴とする請求項10または11に記載の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、無細胞系のタンパク質合成に使用できる抽出液、およびその調製方法、ならびに当該抽出液を使用した無細胞系でのタンパク質合成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、ヒトゲノムを始め多くの生物の遺伝情報が解読されてきている。このような中、ポストゲノム研究として、これらの遺伝情報に対応するタンパク質の機能解析やゲノム創薬が注目を集めている。これらの遺伝情報に対応するタンパク質を医薬品などに応用、利用するには、莫大な種類のタンパク質を短時間で簡単に合成することが必要となってくる。

【0003】 現在、タンパク質の生産方法には、遺伝子組換え技術によって酵母や昆虫細胞などの生細胞を用いる発現系（以下、「細胞系」ということがある）が広く利用されている。しかし、生細胞は自己機能を維持するために外来タンパク質を排除する傾向があり、また生細胞で細胞毒タンパク質を発現すると細胞が生育しないなど発現が困難なタンパク質も多い。

【0004】 一方、細胞系を使用しないタンパク質の生産方法として、細胞破碎液や抽出液に基質や酵素などを加えるなどして生物の遺伝情報翻訳系を試験管内に取り揃え、目的のタンパク質をコードするmRNAを用いて、アミノ酸を望みの順番に必要な残基数結合させることのできる合成系を再構築する、無細胞系のタンパク質合成が知られている。このような無細胞系タンパク質合成では、上記細胞系のタンパク質合成のような制約を受けにくく、生物の命を断つことなくタンパク質の合成を行うことができ、またタンパク質の生産に培養などの操作を伴わないため細胞系と比較して短時間にタンパク質の合成を行うことができる。さらに無細胞系タンパク質合成では、生命体が利用していないアミノ酸配列からなるタンパク質の大量生産も可能となることから、有望な発現方法であると期待されている。このような無細胞系のタンパク質合成としては、たとえば、小麦胚芽の抽出液や大腸菌の抽出液を用いる方法が知られている。

【0005】 しかし、小麦胚芽の抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成では、抽出液の抽出操作が一般に極めて煩雑であるという欠点がある。小麦胚芽の抽出液の調製方法の一例として、たとえば、特許文献1には、以下の手順が記載されている。小麦種子をミルに添加し、破碎した後、篩で粗胚芽画分を得、四塩化炭素とシクロヘキサン混液（四塩化炭素：シクロヘキサン=2.5:1）を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を浮上する画分から回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去する。この胚芽画分に混在する種皮などの不純物を静電気帶電体を用いて吸着除去する。次に、この試料から小麦胚乳成分を完全に除去するため、非イオン性界面活性剤であるNP40の0.5%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄を繰り返す。蒸留水の存在下に再度1回の超音波洗浄を行い、小麦胚芽を純化する。このように小麦胚芽の抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成では、抽出液の調製が煩雑であり、多大な時間と労力を要するという不具合がある。

【0006】 また大腸菌の抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成では、大腸菌が原核生物であるため、タンパク質への糖鎖修飾を行うことができず、糖タンパク質を合成することができないという欠点がある。上記糖鎖修飾によりタンパク質に付加される糖鎖は、物質間や細胞間の認識や接着に関与するシグナルやリガンドとして、タンパク質自身の機能調節因子として、またはタンパク

質の保護や安定化因子として機能しているものと考えられる。そのため、糖鎖修飾を受けるタンパク質について生体内の機能を解析するためには、糖鎖修飾を受けたタンパク質（糖タンパク質）を取得することが必要であり、タンパク質への翻訳の後に糖鎖修飾も行えるような無細胞系のタンパク質合成が望まれている。

【0007】

【特許文献1】特開2000-236896号公報

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、調製が容易であり、糖タンパク質の合成も可能な無細胞系タンパク質合成を実現し得る新規な無細胞系タンパク質合成用抽出液、およびその調製方法、ならびに当該抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、カイコ組織由来の抽出物と、外来mRNAとを少なくとも含有する抽出液が、調製が容易であるとともに、それを用いた無細胞系のタンパク質合成において大量のタンパク質合成が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) カイコ組織由来の抽出物と、外来mRNAとを少なくとも含有する無細胞系タンパク質合成用抽出液。

(2) さらに、プロテアーゼインヒビターを含有する上記(1)に記載の抽出液。

(3) カイコ組織由来の抽出物の含有量が、タンパク質濃度で 1 mg/mL ~ 200 mg/mL である、上記(1)または(2)に記載の抽出液。

(4) カイコ組織が、カイコ幼虫の後部絹糸腺を少なくとも含有する上記(1)~(3)のいずれかに記載の抽出液。

(5) カイコ組織が、カイコ幼虫の脂肪体を少なくとも含有する上記(1)~(3)のいずれかに記載の抽出液。

(6) カイコ組織が、カイコの胚を少なくとも含有する上記(1)~(3)のいずれかに記載の抽出液。

(7) プロテアーゼインヒビターがフェニルメタンスルホニルフルオリドである、上記(2)~(6)のいずれかに記載の抽出液。

(8) カイコ組織由来の抽出物と、プロテアーゼインヒビターとを少なくとも含有することを特徴とする無細胞系タンパク質合成用液状組成物。

(9) 上記(1)~(7)のいずれかに記載の抽出液を使用した無細胞系タンパク質合成方法。

(10) カイコ組織から抽出用液を用いて抽出したカイコ組織由来の抽出物に、外来mRNAを添加することを特徴とする、無細胞系タンパク質合成用抽出液の調製方

法。

(11) 抽出用液がプロテアーゼインヒビターを少なくとも含有するものである上記(10)に記載の調製方法。

(12) カイコ組織から抽出用液を用いて抽出したカイコ組織由来の抽出物に、液状フィブロインを除去する処理を施すことを特徴とする上記(10)または(11)に記載の調製方法。

【0010】なお本明細書において「カイコ」は、カイコガ科に属する鱗翅目昆虫（絹糸昆虫）と同義であり、その一生において「卵（胚）」（産卵直後より孵化直前までの間）、「幼虫」（孵化直後から繭の形成終了直前（1齢期～5齢期に分けられる））、「蛹」（繭の形成終了直前から羽化する直前までの間）、ならびに「成虫（蛾）」（羽化直後より死亡までの間）の各状態を経るものであり、その一生にわたる形態のいずれをも含むものとする。カイコは、卵より孵化した後の幼虫の状態では、桑を食べて発育する期間（齢）と、食べずに脱皮の準備をする期間（眠）を交互に繰り返す。カイコの幼虫において、孵化してから1回目の脱皮までを1齢期、1回目の脱皮から2回目の脱皮までを2齢期といい、通常、4回脱皮して5齢期で成熟する（この成熟した状態のカイコ幼虫は「熟蚕」とも呼ばれる）。カイコの幼虫は、熟蚕になると体が透明になり絹糸を吐いて繭を形成し、蛹化する。蛹の後、羽化して成虫となる。

【0011】本明細書における「絹糸腺」は、カイコ幼虫の両体側において、頭部の下唇先端に位置する吐出口から盲管にまで達する一対の管状の外分泌腺であり、前部絹糸腺、中部絹糸腺および後部絹糸腺に大きく分けられる。後部絹糸腺は、絹糸の中心部を為すフィブロインを分泌する。また中部絹糸腺は、セリシンを分泌する。フィブロインは中部絹糸腺に蓄積されるとともに、セリシンによってその外周を覆われて、ゲル状の絹物質となる。この絹物質は、前部絹糸腺を通って吐出口から排出され、固体化して絹糸となる。

【0012】本明細書における「脂肪体」は、カイコ幼虫において、体内の至るところに分布し、白色の柔らかい扁平な帶状、ひも状あるいは葉状の組織である。脂肪体は、ヒトの肝臓に似て栄養、エネルギー源を貯蔵する役目を果たしているので、細胞内には脂肪球、タンパク質、グリコーゲンその他の新陳代謝に関する種々の物質を含んでいる。

【0013】本明細書における「胚」は、カイコの卵の状態の組織を指すものとする。

【0014】本明細書における「無細胞系タンパク質合成」は、mRNAの情報を読み取ってタンパク質を合成する無細胞翻訳系によるタンパク質合成を指すものとする。ここで、本発明の合成方法によって無細胞系で合成される「タンパク質」は、複数のアミノ酸残基から構成される任意の分子量のペプチド、すなわち低分子量のペ

5
ブチドから高分子量のいずれをも包含するものとする。また本明細書でいう「タンパク質」は、糖鎖修飾されてなる糖タンパク質も含む。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の抽出液における「カイコ組織由来の抽出物」は、カイコの一生のうちのどの状態（卵、幼虫（1齢期～5齢期）、蛹、成虫）のいずれの組織由来であってよい。またカイコ組織は、単一の状態における単一の組織（たとえば、5齢期のカイコ幼虫における後部絹糸腺のみ）由来に限らず、単一の状態における複数の組織（たとえば、5齢期のカイコ幼虫における後部絹糸腺および脂肪体）由来であってもよく、複数の状態における単一の組織（たとえば、3齢期、4齢期、5齢期の各カイコ幼虫における後部絹糸腺）由来であってもよいものとする。無論、複数の状態における複数の組織由来であってもよい。なお上記「カイコ組織由来の抽出物」は、カイコの組織の全体（たとえば、後部絹糸腺全体）からの抽出物である必要はない。

【0016】本発明の抽出液におけるカイコ組織由来の抽出物の含有量に特に制限はないが、タンパク質濃度で1mg/mL～200mg/mLであるのが好ましく、中でも10mg/mL～100mg/mLであるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で1mg/mL未満であると、本発明の作用に必須な成分の濃度が低くなり、充分な合成反応が行えなくなる虞があるためであり、また当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で2.00mg/mLを越えると、抽出液自体が高い粘性を有し、操作しづらい虞があるためである。

【0017】なお上記範囲の量のカイコ組織由来の抽出物を含有する抽出液は、抽出液のタンパク質濃度測定を利用して、調製できる。当該タンパク質濃度測定は、当分野において通常行われているように、たとえばBCA

Protein assay Kit (PIERCE社製)を使用し、反応試葉2mLに対してサンプルを0.1mL加え、37°Cで30分間反応させ、562nmにおける吸光度を測定する、といった手順によって行う。コントロールとしては、通常、ウシ血清アルブミン (BSA)を使用する。

【0018】上記カイコ組織としては、カイコ幼虫の後部絹糸腺、脂肪体およびカイコの胚から選ばれる少なくともいすれかであることが望ましい。抽出液中にカイコ幼虫由来の後部絹糸腺、脂肪体およびカイコの胚から選ばれる少なくともいすれか由来の抽出物が含有されているか否かは、たとえばアルドラーゼについてのアイソザイム解析を行うことによって判別することができる (Nagaokaら(1995)、Insect Biochem Mol Biol. 25, 819-825)。

【0019】カイコ幼虫の後部絹糸腺由来の抽出物を少なくとも含有すると、短時間で大量のタンパク質が合成

可能であるというような特に優れた利点を有する無細胞系タンパク質合成用抽出液を実現できる上で好ましい。

【0020】カイコ幼虫の脂肪体由来の抽出物は、脂肪体が柔らかい組織であるために、すり潰す作業が短時間で済み、結果として容易に抽出液を調製できる、というような特に優れた利点を有する無細胞系タンパク質合成用抽出液を実現できる上で好ましい。なお5齢期の脂肪体については、上記アイソザイム解析以外に、抽出液をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけて脂肪体由来のタンパク質であるSP-1、SP-2などを検出することによっても、抽出液中に含有されているか否かを判別することができる。

【0021】カイコの胚由来の抽出物は、胚が1つの個体であるために、他の組織とは異なり摘出する作業を要さず、結果として容易に抽出液を調製できる、というような特に優れた利点を有する無細胞系タンパク質合成用抽出液を実現できる上で好ましい。なおカイコの胚については、上記アイソザイム解析以外に、抽出液をSDS-PAGEにかけて胚由来のタンパク質である30K、ESP、Vitelin (H)、Vitelin (L)などを検出することによっても、抽出液中に含有されているか否かを判別することができる。

【0022】抽出物がカイコ幼虫の後部絹糸腺または脂肪体由来である場合、カイコ幼虫の1齢期～5齢期のものであれば、特に制限なく本発明に使用できるが、当該後部絹糸腺または脂肪体は、5齢期のカイコ幼虫由来であるのが好ましい。これは、5齢期のカイコ幼虫においては、後部絹糸腺および脂肪体が1齢期～5齢期のうちで最も成熟しており、これを用いることで他の齢期のものと比べて短時間で大量のタンパク質合成が可能である、というような利点を有する。中でも特に、絹糸の主成分である絹フィブロインを活発につくり、高いタンパク質合成能を有しているという観点から、本発明の抽出液は、5齢期のカイコ幼虫の後部絹糸腺、中でも5齢期の3日目～7日目のカイコ幼虫の後部絹糸腺からの抽出物を必須成分として含有していることが好ましい。

【0023】また本発明の抽出液においては、外来mRNAが、上記のカイコ組織由来の抽出物とともに必須成分として含有される。ここで、「外来mRNA」は、カイコ組織に由来しないmRNAを指し、カイコ組織に由来しないmRNAであるならば、コードするタンパク質（ペプチドを含む）に特に制限はなく、毒性を有するタンパク質をコードするものであってもよいし、また糖タンパク質をコードするものであってもよい。なお、抽出液において、含有されるmRNAが外来mRNAであるかカイコ組織に由来するmRNAであるかは、まず、抽出液中より、mRNAを単離精製後、逆転写酵素によりcDNAを合成し、得られたcDNAの塩基配列を解析し、既知の外来mRNAの塩基配列と比較することで判

別することができる。

【0024】なお本発明に用いる外来mRNAは、その塩基数に特に制限はなく、目的とするタンパク質を合成し得るならばmRNA全てが同じ塩基数でなくともよい。また、目的とするタンパク質を合成し得る程度に相同な配列であれば、各mRNAは、複数個の塩基が消失、置換、挿入または付加されたものであってよい。

【0025】当該抽出液中において、外来mRNAは、タンパク質合成の速度の観点から、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $15\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $1700\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。外来mRNAが $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、これを用いたタンパク質合成の際にタンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0026】このようなカイコ組織由来の抽出物と外来mRNAとを含有する抽出液を用いてタンパク質合成反応を行うことによって、如何なるタンパク質、例えば生細胞で細胞毒となるタンパク質であっても、短時間にて合成することが可能となる。また、真核生物であるカイコ由来の抽出物を用いているため、糖タンパク質を無細胞系で合成することも可能であり、特に制限されることなく多くの種類のタンパク質を合成することができる。さらに、このような抽出液は、後述するように従来の小麦胚芽からの抽出液の調製と比較して、無細胞系タンパク質合成に供することのできる抽出液を、格段に容易に調製することができ、効率的な無細胞系タンパク質合成を実現できる。

【0027】また本発明の抽出液は、上記のカイコ組織由来の抽出物および外来mRNAに加えて、プロテアーゼインヒビターをさらに含有することが好ましい。プロテアーゼインヒビターをさらに含有することによって、調製が容易であり、タンパク質（糖タンパク質も含む）の合成を効率的に行うことができ、無細胞系タンパク質用として非常に有用な抽出液を提供することができる。これは、プロテアーゼインヒビターによりカイコ組織由来の抽出物に含有されるプロテアーゼの活性が阻害され、当該プロテアーゼによる抽出物中の活性タンパク質の不所望な分解を防止でき、結果としてカイコ組織由来の抽出物が有するタンパク質合成能を有效地引き出すことができるようになるためであると考えられる。

【0028】このようなプロテアーゼインヒビターとしては、プロテアーゼの活性を阻害し得るものであるならば特に制限はなく、たとえば、フェニルメタンスルホニルフルオリド（以下、「PMSF」ということがある。）、アプロチニン、ベスタチン、ロイベブチン、ベブスタチンA、E-64（L-*trans*-エポキシスクシニルロイシルアミド-4-グアニジノブタン）、エチレンジアミン四酢酸、ホスホラミドなどを使用することができるが、カイコ組織由来の抽出液にはセリンプロテアーゼが含まれることから、上記中でも、セリンプロ

テアーゼに対して特異性の高いインヒビターとして働くPMSFを使用するのが好ましい。また、1種類のプロテアーゼインヒビターのみならず、数種類のプロテアーゼインヒビターの混合物（プロテアーゼインヒビターカクテル）を用いてもよい。

【0029】当該抽出液中におけるプロテアーゼインヒビターの含有量に特に制限はないが、本発明の作用に必須な酵素類の分解阻害能を好適に発揮できる観点から、 $1\text{ }\mu\text{M}$ ～ $50\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $0.01\text{ }\text{mM}$ ～ $5\text{ }\text{mM}$ 含有されることがより好ましい。プロテアーゼインヒビターが $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満であると、プロテアーゼの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またプロテアーゼインヒビターが $50\text{ }\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

【0030】また本発明の抽出液は、上記の抽出物、外来mRNAおよびプロテアーゼインヒビターに加えて、カリウム塩、マグネシウム塩、ジチオトレイトルおよび緩衝剤を少なくとも含有するのが好ましい。これにより、本発明の作用に必須な成分を安定に保つことができる、というような利点をさらに有する無細胞系タンパク質合成用の抽出液を実現できる。

【0031】上記カリウム塩としては、本発明の作用を阻害するようなものでなければ特に制限はなく、たとえば酢酸カリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素二カリウム、クエン酸水素二カリウム、硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、ヨウ化カリウム、フタル酸カリウムなど一般的な形態で使用することができ、中でも酢酸カリウムを使用するのが好ましい。カリウム塩は、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

【0032】当該抽出液中におけるカリウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸カリウムなど1価のカリウム塩である場合、 $1\text{ }\text{mM}$ ～ $50\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $50\text{ }\mu\text{M}$ ～ $200\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。カリウム塩が $10\text{ }\mu\text{M}$ 未満または $500\text{ }\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0033】上記マグネシウム塩としては、本発明の作用を阻害するようなものでなければ特に制限はなく、たとえば酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、リン酸水素マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、乳酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、シウウ酸マグネシウムなど一般的な形態で使用することができ、中でも酢酸マグネシウムを使用するのが好ましい。マグネシウム塩も、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

【0034】当該抽出液中におけるマグネシウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たと

えば酢酸マグネシウムなど2価の塩である場合、0.1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。マグネシウム塩が0.1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0035】上記ジチオトレイトル（以下、「DTT」ということがある。）は、酸化防止の目的で配合されるものであり、当該抽出液中において0.1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。DTTが0.1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0036】上記緩衝剤は、抽出液に緩衝能を付与し、たとえば酸性または塩基性物質の添加などによって起こる抽出液のpHの急激な変化による抽出物の変性を防止する目的で配合される。このような緩衝剤としては、特に制限はなく、たとえば、HEPES-KOH、Tris-HCl、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPESなどを使用することができる。緩衝剤は、当該抽出液のpHが4～10に保持されるようなものを使用するのが好ましく、pHが6～8に保持されるようなものを使用するのがより好ましい。抽出液のpHが4未満またはpHが10を越えると、本発明の反応に必須な成分が変性する虞があるためである。このような観点より、上記中でもHEPES-KOH（pH 6～8）を使用するのが特に好ましい。

【0037】当該抽出液中における緩衝剤の含有量に特に制限はないが、好適な緩衝能を保持する観点から、5 mM～200 mM含有されることが好ましく、10 mM～50 mM含有されることがより好ましい。緩衝剤が5 mM未満であると、酸性または塩基性物質の添加によりpHの急激な変動を引き起こし、抽出物が変性する傾向にあるためであり、また緩衝剤が200 mMを越えると、塩濃度が高くなり過ぎ、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0038】すなわち、本発明の抽出液は、後部絨糸腺、脂肪体および胚のうちの少なくともいずれかの抽出物をタンパク質濃度で1 mg/mL～200 mg/mL含有するとともに、1 μg/mL～10 mg/mLの外来mRNA、10 mM～500 mMの酢酸カリウム、0.1 mM～10 mMの酢酸マグネシウム、0.1 mM～10 mMのDTT、1 μM～50 mMのPMSF、5 mM～200 mMのHEPES-KOH（pH 6～8）を含有するように実現されるのが好ましい。

【0039】本発明はまた、無細胞系タンパク質合成用抽出液の新規な調製方法を提供する。本発明の抽出液の調製方法は、カイコ組織から抽出用液を用いて抽出したカイコ組織由来の抽出物に、外来mRNAを添加して抽出

出液とするものである。本発明の抽出液の調製方法においては、カイコ組織からの抽出を行う処理を少なくとも含有し、好ましくは、カイコ組織からの抽出後、精製を行う。具体的には、次のような手順にて行う。

【0040】まず、常法にしたがって、たとえばハサミ、ピンセット、メスなどの器具を使用して、カイコより所望の組織を摘出する。この摘出によって得る後述の抽出に使用する組織量としては、特に制限はないが、通常、1 g～100 gの範囲内である。次に、摘出した組織を、たとえば液体窒素で凍結した後、-80°Cで凍結させた乳鉢を用いてすり潰し、抽出用液で抽出する。ここで使用する抽出用液は、従来公知の抽出に用いる緩衝液を特に制限なく使用することができるが、好ましくは、プロテアーゼインヒビター、カリウム塩、マグネシウム塩、DTTおよび緩衝剤を含有するものを使用する。特に好ましくは、0.01 mM～5 mMのPMSF、50 mM～200 mMの酢酸カリウム、0.5 mM～5 mMの酢酸マグネシウム、0.5 mM～5 mMのDTT、10 mM～50 mMのHEPES-KOH（pH 6～8）を含有する抽出用液を使用する。このようにして、まず、カイコの組織からの抽出物を含有する液状物を得る。

【0041】次に、上記抽出処理で得られた液状物を遠心分離にかける。該遠心分離は、当分野において通常行われている条件（10000×g～50000×g、0°C～10°C、10分間～60分間）で行う。本発明の調製方法においては、該遠心分離を1回行った後の上清（以下、「上清1」と呼ぶ。）をそのまま用い、これに外来mRNAを添加して抽出液とするようにしてもよい（以下、「調製方法1」と呼ぶ。）し、また、該上清に上記の条件にて再度の遠心分離を行い、得られた上清（以下、「上清2」と呼ぶ。）に外来mRNAを添加するようにしてもよい（以下、「調製方法2」と呼ぶ。）。あるいは、上記遠心分離で得られた上清をゲル通過し、ゲル通過後の滤液より280 nmにおける吸光度が10以上の画分を分取する処理を行い、得られた液状物に外来mRNAを添加するようにしてもよい（以下、「調製方法3」と呼ぶ。）。図1は、上記調製方法1～3を簡略化して示すフローチャートである。

【0042】上記調製方法3を行う場合、具体的には以下の手順にて行う。まず、遠心分離後の上清についてゲル通過を行うが、ゲル通過は、たとえば脱塩カラムPD-10（アマシャム・バイオサイエンス社製）を好適に使用することができ、常法にしたがって、ゲル通過用緩衝液にてカラムを平衡化した後、試料を供給し、上記抽出用液にて溶出する、というような条件にて行えばよい。上記ゲル通過用緩衝液は、上記抽出用液にグリセロールを添加したものであることが好ましい。これにより、タンパク質合成に必須な成分を安定化できるというような利点がある。グリセロールは、通常、5(v/v)

v) %～40 (v/v) % (好ましくは、20 (v/v) %) となるように添加すればよい。

【0043】ゲル濾過して得られる濾液は、通常のゲル濾過で行われているように、0.1mL～1mLを1画分とすればよく、高いタンパク質合成能を有する画分を効率よく分取するという観点より、0.4mL～0.6mLを1画分とするのが好ましい。

【0044】次に、ゲル濾過後の濾液より280nmにおける吸光度が10以上の画分を分取する。当該処理は、たとえばUltra spec 3300 pro (アマシャムバイオサイエンス社製)などの機器を用いて、各画分について上記280nmにおける吸光度を測定し、この吸光度が10以上の画分を分取する。このようにして得られる画分に外来mRNAを添加して、本発明の抽出液を得る。なお本発明の抽出液は、上記280nmにおける吸光度が10以上の複数の画分を混合したものに外来mRNAを添加したものであっても当然よい。

【0045】また、本発明の抽出液は、タンパク質合成能のより高い抽出液を得る観点からは、液状フィブロインを除去する工程を含有する以下の調製方法 (以下、「調製方法4」と呼ぶ。) によって、調製されるのが好ましい。抽出液に液状フィブロインが混入していると、この液状フィブロイン自体によって該抽出液を用いた後述するタンパク質合成反応が阻害される虞があり、また、カイコ組織中のタンパク質合成反応に必須な成分 (たとえば、リボソーム、アミノアシルtRNAシンセターゼ、各種翻訳因子など) が液状フィブロイン中に取り込まれてしまい、それら成分を抽出することが困難となり、結果として抽出液中に含有される必須成分量が減少するため、タンパク質合成量が低下する虞があるためである。また液状フィブロインの混入により、抽出液自体の粘性が高くなってしまい、タンパク質合成反応が進行しづらく、操作性も悪くなる虞もある。

【0046】図2は、上記調製方法4を簡略化して示すフローチャートである。具体的には、まず、pH4～1.0の抽出用液を用いて上記の抽出を行った後、上述したようにして1回の遠心分離を行って得られた上清 (上記上清1)、再度の遠心分離を行って得られた上清 (上記上清2)、または該再度の遠心分離によって得られた下層をインキュベーションした後、凍結させる。解凍後、遠心分離して得られた上清 (以下、「上清3」と呼ぶ。) に、外来mRNAを添加して抽出液とする。あるいは、該上清3をゲル濾過して得られた濾液 (280nmにおける吸光度が10以上の画分) に、外来mRNAを添加して抽出液とする。かかる調製方法4では、まず、pH4～1.0の抽出用液を用いることで、カイコ組織からの抽出の際に液状フィブロインを固化させ、その結果、液状フィブロインが除去された抽出液を調製する。さらに、上記上清1、上清2または下層を、インキュベーションした後凍結させる処理を行うことで、液状

フィブロインの固化をより進行させて、液状フィブロインを効率的に除去することが可能であり、かつ、液状フィブロインに取り込まれていたタンパク質合成反応に必須な成分を効率的に抽出することが可能である。

【0047】上記調製方法4にて抽出液を調製する場合、抽出用液としては、pH4～1.0、好ましくはpH6～8、より好ましくはpH6～7のものを用いる。pH4未満の抽出用液を用いると、後述するタンパク質合成反応に必須な成分が変性してしまう虞があるためである。また、pHが1.0を越える抽出用液を用いると、上記と同様にタンパク質合成反応に必須な成分が変性してしまう虞があり、また液状フィブロインの固化が生じない虞もあるためである。

【0048】上清1、上清2または上記下層のインキュベーションの条件に特に制限はなく、従来より当業者が通常行っている条件によって行えばよいが、インキュベーションの温度は、40°C以下が好ましく、30°C以下がより好ましい。該温度が40°Cを越えると、上記タンパク質合成反応に必須な成分が変性してしまう傾向にあるためである。また、インキュベーション時間は、24時間以下であるのが好ましく、6時間以下であるのがより好ましい。インキュベーションの時間が24時間を越えると、反応に必須な成分が変性してしまう虞があるためである。

【0049】上記インキュベーション後の凍結も、従来より当業者が通常行っている条件によって行えばよく特に制限されるものではないが、-10°C以下で凍結するのが好ましく、-20°C以下で凍結するのがより好ましい。-10°Cよりも高い温度で凍結すると、上記タンパク質合成反応に必須な成分が変性してしまう傾向にあるためである。また、凍結時間は、72時間以下であるのが好ましく、48時間以下であるのがより好ましい。72時間を越えて凍結しても、液状フィブロインの固化は既に完了しており、更なる固化は期待できないためである。

【0050】解凍後の遠心分離の条件にも特に制限はなく、たとえば、上記と同様の10000×g～50000×g、0°C～10°C、10分間～60分間の条件で行えばよい。該遠心分離で得られた上清 (上清3) に、そのまま外来mRNAを添加するか、あるいは、該上清3をゲル濾過し、ゲル濾過後の濾液より280nmにおける吸光度が10以上の画分を分取する処理を行い、得られた液状物に外来mRNAを添加すればよい。上記ゲル濾過および画分の分取処理を行う場合には、上述したのと同様に行えばよい。

【0051】所望の量の上記抽出物を含有する抽出液を得るためには、通常、複数体のカイコより抽出する必要がある。抽出に供するカイコの数は、使用するカイコの状態や個体差によっても異なるが、カイコ幼虫については、齶の形成期に近づくにつれて組織の成熟に伴って、

同量の抽出物を得るために要する数は少なくて済む。特に絹糸腺は、5齢期のカイコ幼虫において日を追うごとに著しく成熟するため、たとえば、5齢期の1日目で30匹程度のカイコ幼虫からと同程度の量を5齢期の7日目では6匹～7匹程度のカイコ幼虫から得ることができる。

【0052】なお本発明の無細胞系タンパク質合成用抽出液は、上記の調製方法で得られると、上述したような利点を有する上で好ましいが、必ずしも上記調製方法で得られたものでなくともよい。

【0053】また本発明は、カイコ組織由来の抽出物と、プロテアーゼインヒビターとを少なくとも含有する無細胞系タンパク質合成用の液状組成物も提供する。この液状組成物に含有されるカイコ組織由来の抽出物およびプロテアーゼインヒビターは、本発明の抽出液について上述したのと同様である。また、本発明の液状組成物も、外来mRNAを含有しない以外は上述したのと同様の含有量にて、カリウム塩、マグネシウム塩、ジチオトレイトールおよび緩衝剤をさらに含有するのが好ましい。かかる液状組成物を用いて無細胞系タンパク質合成反応を行う場合には、反応液に外来mRNAをさらに添加する以外は、後述の抽出液からの反応液の調製と同様にして行えばよい。

【0054】本発明はまた、上記抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供するものである。当該タンパク質合成に使用する反応液としては、無細胞系のタンパク質合成の分野において従来より一般に使用されているものであれば特に制限はない。

【0055】なお上記反応液は、本発明の抽出液が10(v/v)%～80(v/v)%、特には30(v/v)%～60(v/v)%含有されるように調製されるのが好ましい。すなわち、上記反応液の全体において、カイコ組織由来の抽出物の含有量が、タンパク質濃度で0.1mg/mL～160mg/mLとなるように調製されるのが好ましく、3mg/mL～60mg/mLとなるように調製されるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で0.1mg/mL未満または160mg/mLを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。また、反応液の全体において、外来mRNAは、1μg/mL～1000μg/mL含有されることが好ましく、10μg/mL～500μg/mL含有されることがより好ましい。mRNAが1μg/mL未満または1000μg/mLを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0056】通常、上記反応液としては、上記抽出液を除く成分として、カリウム塩、マグネシウム塩、DTT、アデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、クレアチニン酸、クレアチニンキナーゼ、アミノ酸成分、RNaseインヒビター、tRNA、緩衝剤を少なくとも含

有するものを用いる。これにより、短時間で大量のタンパク質の合成が可能であるというような利点をさらに有する無細胞系タンパク質合成用の反応液を実現できる。

【0057】当該反応液中におけるカリウム塩としては、抽出液の成分として上述した各種のカリウム塩、好適には酢酸カリウム、を好ましく使用できる。カリウム塩は、上述した抽出液におけるカリウム塩の場合と同様の観点から、当該反応液中において、10mM～500mM含有されることが好ましく、50mM～150mM含有されることがより好ましい。

【0058】当該反応液中におけるマグネシウム塩としては、抽出液の成分として上述した各種のマグネシウム塩、好適には酢酸マグネシウム、を好ましく使用できる。マグネシウム塩は、上述した抽出液におけるマグネシウム塩の場合と同様の観点から、当該反応液中において、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.5mM～3mM含有されることがより好ましい。

【0059】当該反応液中におけるDTTは、上述した抽出液におけるDTTの場合と同様の観点から、0.1mM～10mM含有されることが好ましく、0.2mM～5mM含有されることがより好ましい。

【0060】当該反応液中におけるアデノシン三リン酸(以下、「ATP」ということがある。)は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。ATPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0061】当該反応液中におけるグアノシン三リン酸(以下、「GTP」ということがある。)は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において0.01mM～10mM含有されることが好ましく、0.1mM～5mM含有されることがより好ましい。GTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0062】当該反応液中におけるクレアチニン酸は、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、ATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチニン酸は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において1mM～200mM含有されることが好ましく、10mM～100mM含有されることがより好ましい。クレアチニン酸が1mM未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチニン酸が200mMを越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0063】当該反応液中におけるクレアチニナーゼは、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、クレアチニン酸と共にATPとGTPを再生する

目的で配合される。クレアチンキナーゼは、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。クレアチンキナーゼが $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンキナーゼが $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0064】当該反応液中におけるアミノ酸成分は、20種類のアミノ酸、すなわち、バリン、メチオニン、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、イソロイシン、トリプトファン、アスパラギン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、チロシン、リシン、グルタミン、シスチン、アルギニン、の20種類のアミノ酸を少なくとも含有する。このアミノ酸には、ラジオアイソトープ標識されたアミノ酸も含まれる。さらに、必要に応じて、修飾アミノ酸を含有していてもよい。当該アミノ酸成分は、通常、各種類のアミノ酸を概ね等量ずつ含有してなる。本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において上記のアミノ酸成分が $1\text{ }\mu\text{M}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{M}$ ～ $200\text{ }\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。アミノ酸成分が $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満または $1000\text{ }\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0065】当該反応液中におけるRNaseインヒビターは、抽出液に混在するカイコ由来のRNaseによって、本発明の無細胞系タンパク質合成の際にmRNAやtRNAが不希望に消化されて、タンパク質の合成を妨げるのを防ぐ目的で配合されるものであり、当該反応液中において $0.1\text{ U}/\mu\text{L}$ ～ $100\text{ U}/\mu\text{L}$ 含有されることが好ましく、 $1\text{ U}/\mu\text{L}$ ～ $10\text{ U}/\mu\text{L}$ 含有されることがより好ましい。RNaseインヒビターが $0.1\text{ U}/\mu\text{L}$ 未満であると、RNaseの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNaseインヒビターが $100\text{ U}/\mu\text{L}$ を越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

【0066】当該反応液中におけるtRNAは、上記20種類のアミノ酸に対応した種類のtRNAを概ね等量ずつ含有してなる。本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。tRNAが $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0067】反応液に含有される緩衝剤としては、上述した本発明の抽出液と同様のものが好適に使用でき、同

様の理由から、HEPES-KOH (pH 6～8) を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出液における緩衝剤の場合と同様の観点から、 5 mM ～ 200 mM 含有されることが好ましく、 10 mM ～ 50 mM 含有されることがより好ましい。

【0068】また上記反応液は、グリセロールを含有するのがより好ましい。グリセロールを添加すると、タンパク質合成反応においてタンパク質合成に必須な成分を安定化できるというような利点があるためである。グリセロールを添加する場合、通常、 5 (v/v)\% ～ 20 (v/v)\% となるように添加する。

【0069】さらに、上記反応液は、エチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)四酢酸(以下、「EGTA」ということがある。)を含有するのが好ましい。EGTAを含有すると、EGTAが抽出液中の金属イオンとキレートを形成することでリボヌクレアーゼ、プロテアーゼなどを不活性化することにより、本発明のタンパク質合成に必須な成分の分解を阻害することができるためである。該EGTAは、上記反応液中において、上記分解阻害能を好適に発揮し得る観点から 0.01 mM ～ 10 mM 含有されることが好ましく、 0.1 mM ～ 5 mM 含有されることがより好ましい。EGTAが 0.01 mM 未満であると必須な成分の分解活性を充分に抑えることができない傾向にあるためであり、また、 10 mM を越えるとタンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

【0070】すなわち、本発明の無細胞系タンパク質合成方法に用いる反応液は、上記抽出液を 30 (v/v)\% ～ 60 (v/v)\% 含有するとともに、 50 mM ～ 1

30 50 mM の酢酸カリウム、 0.5 mM ～ 3 mM の酢酸マグネシウム、 0.2 mM ～ 5 mM のDTT、 5 (v/v)\% ～ 2.0 (v/v)\% のグリセロール、 0.1 mM ～ 5 mM のATP、 0.1 mM ～ 5 mM のGTP、 10 mM ～ 100 mM のクレアチニン酸、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のクレアチンキナーゼ、 $10\text{ }\mu\text{M}$ ～ $200\text{ }\mu\text{M}$ のアミノ酸成分、 $1\text{ U}/\mu\text{L}$ ～ $10\text{ U}/\mu\text{L}$ のRNaseインヒビター、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のtRNA、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNA、 10 mM ～ 50 mM のHEPES-KOH (pH 6～8) を含有するように実現されるのが好ましい。また、上記に加えてさらに 0.1 mM ～ 5 mM のEGTAを含有するように実現されるのがより好ましい。

【0071】本発明の無細胞系タンパク質合成方法は、上記のような本発明の抽出液を含有する反応液を用いて、従来公知のたとえば低温恒温槽にて行う。

【0072】また反応温度は、通常、 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲内である。反応温度が $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 未満であると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあり、また反応温度が $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ を越えると、必須な

成分が変性する傾向にあるためである。反応の時間は、通常、1時間～72時間、好ましくは3時間～24時間である。

【0073】本発明の無細胞系タンパク質合成方法にて合成されたタンパク質の量は、酵素の活性の測定、SDS-PAGE、免疫検定法などによって測定できる。

【0074】本発明の無細胞系のタンパク質合成方法にて合成できるタンパク質に特に制限はない。

【0075】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例1

カイコ幼虫の後部絹糸腺由來の抽出液の調製

5齢期に達したカイコ幼虫を1日目から7日目まで1日ごとにサンプリングした。サンプリングしたカイコから、ハサミ、ピンセット、メスを使用して、後部絹糸腺を摘出し、以下の手順に従って各日の後部絹糸腺について抽出を行った。サンプリングしたカイコ幼虫の数と摘出した後部絹糸腺の量を表1に示す。

【0076】

【表1】

生育日数	匹数	組織量(g)
絹糸腺1日	30	1.81
絹糸腺2日	23	2.04
絹糸腺3日	15	2.72
絹糸腺4日	15	3.07
絹糸腺5日	8	1.99
絹糸腺6日	8	2.28
絹糸腺7日	7	1.95

【0077】抽出は、まず、5齢期のカイコ幼虫より摘出した後部絹糸腺を、それぞれ液体窒素で凍結し、-80°Cで凍結させた乳鉢ですり潰し、下記組成の抽出用液を用いて、抽出を行った。

抽出用液の組成

- 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4)
- 100 mM 酢酸カリウム
- 2 mM 酢酸マグネシウム
- 2 mM DTT
- 0.5 mM PMSF

抽出後、得られた液状物を遠心分離機(himac CR 20 B 3(日立工機社製))にて、30000×g、30分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離し、再び30000×g、10分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離した。脱塩カラム PD-10(アマシャムバイオサイエンス社製)にて、20%グリセロールを含む抽出用液を加えカラムを平衡化した後、上清を供給し、上記抽出用液にて溶出することによりゲル濾過を行った。ゲル濾過後の濾液の画分を、分光光度計(Ultron spec 3300 pro、アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて、280 nmにおける吸光度が1

0以上の画分を分取して、これに40 μg/mLの外来mRNAを添加し、5齢期のカイコ幼虫の後部絹糸腺由來の無細胞系タンパク質合成用抽出液を得た。外来mRNAとしては、ルシフェラーゼをコードするmRNA(ルシフェラーゼコントロールRNA、プロメガ社製)を用いた。得られた抽出液について、BCA Protein assay Kit (PIERCE社製)を用い、タンパク質濃度を測定した。まず反応試薬2 mLに對してサンプルを0.1 mL加え、37°Cで30分間反応させ、分光光度計(Ultron spec 3300 pro、アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて、562 nmにおける吸光度を測定した。コントロールとして、BSAを用い、検量線を作成した。得られた各抽出液のタンパク質濃度は、次のとおりであった。

【0078】

【表2】

生育日数	タンパク質濃度(mg/mL)
絹糸腺1日	8.8
絹糸腺2日	11.5
絹糸腺3日	14.6
絹糸腺4日	17.5
絹糸腺5日	7.9
絹糸腺6日	18.7
絹糸腺7日	19.3

【0079】熟練者(1人)が上記の調製方法にて抽出液を調製するのにかかった平均時間は、約2時間であった。

【0080】実施例2

カイコ幼虫の脂肪体由來の抽出液の調製

1日目から7日目まで1日ごとにサンプリングしてなる5齢期に達したカイコ幼虫より、脂肪体を摘出して、各日の脂肪体を含有する抽出液をそれぞれ調製した以外は、実施例1と同様に行った。サンプリングしたカイコ幼虫の数と摘出した脂肪体の量を表3に、得られた各抽出液のタンパク質濃度を表4に示す。

【0081】

【表3】

生育日数	匹数	組織量(g)
脂肪体1日	30	1.94
脂肪体2日	23	1.87
脂肪体3日	15	2.10
脂肪体4日	15	1.51
脂肪体5日	8	1.83
脂肪体6日	8	2.52
脂肪体7日	7	2.11

【0082】

【表4】

生育日数	タンパク質濃度(mg/mL)
脂肪体1日	13.3
脂肪体2日	16.5
脂肪体3日	28.3
脂肪体4日	31.6
脂肪体5日	29.0
脂肪体6日	58.9
脂肪体7日	51.9

50 【0083】熟練者(1人)が上記の調製方法にて抽出

液を調製するのにかかった平均時間は、約2時間であつた。

【0084】実験例1

：実施例1、2の抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質

〔反応液の組成〕

・ 50 (v/v) %	抽出液 (反応液中における外来mRNA: 20 μg/mL)
・ 30 mM	HEPES-KOH (pH 7.4)
・ 100 mM	酢酸カリウム
・ 1 mM	酢酸マグネシウム
・ 3 mM	DTT
・ 10 (v/v) %	グリセロール
・ 0.5 mM	ATP
・ 0.1 mM	GTP
・ 25 mM	クレアチニン酸
・ 200 μg/mL	クレアチニナーゼ
・ 40 μM	アミノ酸 (20種)
・ 1 U/μL	RNaseインヒビター
・ 200 μg/mL	tRNA

ATP (シグマ社製)、GTP (シグマ社製)、アミノ酸 (20種) (シグマ社製)、RNaseインヒビター (宝酒造社製)、tRNA (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)をそれぞれ用いた。各々調製した反応液を用いて、反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000 (東京理化器械社製)を用い、無細胞系のタンパク質 (ルシフェラーゼ)の合成反応を行った。反応液量は25 μLとした。反応温度は20°Cとし、反応時間ごとにサンプリングを行い、合成されたルシフェラーゼ量を測定した。合成されたルシフェラーゼは、ルシフェラーゼアッセイキット (E-1500、プロメガ社製)を用いて各々定量した。ルシフェラーゼアッセイ試薬50 μLに反応液2.5 μLを添加し、ルミノメーター (Turner Designs STD-20/20、プロメガ社製)を用いて、ルシフェラーゼによる発光を測定した。

【0085】図3は、実施例1の抽出液 (カイコ幼虫の後部絹糸腺を含有)を用いた各反応液についての、反応開始より2時間後のルシフェラーゼ合成量を示すグラフである。図3において、縦軸はルシフェラーゼ合成量 (ng/mL)を示し、横軸は5齢期カイコ幼虫の生育

日数を示す。また図4は、実施例2の抽出液 (カイコ幼虫

〔反応液の組成〕

・ 50 (v/v) %	抽出液 (カイコ幼虫5齢期4日目の後部絹糸腺を含有)
・ 30 mM	HEPES-KOH (pH 7.4)
・ 75 mM	酢酸カリウム
・ 1.5 mM	酢酸マグネシウム
・ 0.5 mM	DTT
・ 10 (v/v) %	グリセロール
・ 0.5 mM	ATP

* 質合成

上記実施例1、2で得られた各抽出液を用いて、下記の組成の反応液を調製した。

20※虫の脂肪体を含有)を用いた各反応液についての反応開始より2時間後のルシフェラーゼ合成量を示すグラフである。図4において、縦軸はルシフェラーゼ合成量 (ng/mL)を示し、横軸は5齢期カイコ幼虫の生育日数を示す。

【0086】また図5は、実施例1の抽出液を用いた各反応液 (1日目~7日目の各日のサンプル)についての、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量を示すグラフである。図5において、縦軸はルシフェラーゼ合成量 (ng/mL)を示し、横軸は反応時間 (分)を示す。図5に示すように、5齢期4日目のカイコ幼虫の後部絹糸腺由来の抽出物を含有する抽出液を用いて調製した無細胞系タンパク質合成用の反応液は、6時間後まで反応が継続し、397.4 ng/mLのルシフェラーゼが合成されていることがわかった。さらに、この反応液を用いた反応では、23時間後には657.4 ng/mLのルシフェラーゼが合成されていた。

【0087】実験例2

実施例1の抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成反応における各成分添加量の影響を調べたところ、最適な反応液組成は、以下のとおりであった。

21

- ・ 0.5 mM GTP
- ・ 0.25 mM EGTA
- ・ 25 mM クレアチニン酸
- ・ 200 μg/mL クレアチニナーゼ
- ・ 40 μM アミノ酸(20種)
- ・ 2 U/μL RNaseインヒビター
- ・ 200 μg/mL tRNA

上記最適化した組成の反応液を用い、反応温度を25°Cとした以外は上記実験例1で行ったのと同様にしてルシフェラーゼの合成を行った。図6は、上記最適化した組成の反応液についての、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量を示すグラフである。図6において、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μg/mL)を示し、横軸は反応時間(分)を示す。図6に示すように、組成を最適化した反応液では、4時間まで反応が継続し、4.6 μg/mLのルシフェラーゼが合成されていることがわかった。

【0088】実験例3

：カイコの胚由来の抽出液の調製

産下後25°Cに保温した0日目、2日目、5日目および7日目のカイコの卵をそれぞれ2g採取し、実験例1と同様の方法で抽出液を調製した。得られた各抽出液のタンパク質濃度は、次のとおりであった。

【0089】

【表5】

保温日数	タンパク質濃度(mg/mL)
0日	55.5
2日	65.7
5日	46.4
7日	27.0

〔抽出用液の組成〕

- ・ 20 mM HEPES-KOH (pH 7.0)
- ・ 100 mM 酢酸カリウム
- ・ 2 mM 酢酸マグネシウム
- ・ 1 mM DTT
- ・ 0.5 mM PMSF

抽出後、得られた液状物を遠心分離機(himac CR 20 B 3(日立工機社製))にて、30000×g、10分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離し、再び30000×g、30分間、4°Cの条件にて遠心分離を行い、下層を単離した。この下層を室温(25°C)、6時間インキュベーションを行った後、-80°C、一昼夜凍結させた。凍結させた下層を室温にて解凍後、22000×g、60分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離した。得られた上清に、320 μg/mLの外来mRNAを添加し、5齢期のカイコ幼虫の後部緑糸腺由来の無細胞系タンパク質合成用抽出液を得た。外来mRNAとしては、ルシフェラーゼをコードするmRNA

〔反応液組成〕

・ 50 (v/v) % 抽出液(反応液中における外来mRNA: 160 μg/

22

10

* 【0090】熟練者(1人)が上記の調製方法にて抽出液を調製するのにかかった平均時間は、約1.5時間であつた。

【0091】実験例3

：実験例3の抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成

上記実験例3で得られた各抽出液を用いた以外は、上記の実験例1と同様の組成で反応液を作成し、無細胞系のタンパク質(ルシフェラーゼ)合成を行つた。その結果、2日目の胚由来の抽出液を用いた場合、16 ng/mLのルシフェラーゼが合成されていた。

【0092】実験例4

：カイコ幼虫の後部緑糸腺由来の抽出液の調製

5齢期の5日目に達したカイコ幼虫をサンプリングした。サンプリングしたカイコから、ハサミ、ビンセット、メスを使用して、後部緑糸腺を摘出し、以下の手順に従つて後部緑糸腺について抽出を行つた。抽出は、まず、5齢期の5日目に達したカイコ幼虫より摘出した後部緑糸腺を液体窒素で凍結し、-80°Cで凍結させた乳棒で碎り潰し、下記組成の抽出用液を用いて、抽出を行つた。

*

※ (ルシフェラーゼコントロールRNA、プロメガ社製)を用いた。この抽出液について分光光度計(Ultraviolet spectrophotometer、アマシャムバイオサイエンス社製)を用いた280 nmにおける吸光度は62.4であった。熟練者(1人)が上記の調製方法にて抽出液を調製するのにかかった平均時間は、24時間であつた。

【0093】実験例4

：実験例4の抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成

上記実験例4で得られた抽出液を用いて、下記の組成の反応液を調製し、実験例1で行ったのと同様にしてルシフェラーゼの合成を行つた。

mL)

· 30 mM	HEPES-KOH (pH 7. 4)
· 100 mM	酢酸カリウム
· 1. 5 mM	酢酸マグネシウム
· 0. 5 mM	DTT
· 10% (v/v) %	グリセロール
· 0. 5 mM	ATP
· 0. 5 mM	GTP
· 0. 25 mM	EGTA
· 25 mM	クレアチニン酸
· 200 μg/mL	クレアチニナーゼ
· 40 μM	アミノ酸 (20種)
· 2 U/μL	RNAse インヒビター
· 200 μg/mL	tRNA

図7は、実施例4の抽出液(カイコ幼虫の後部絹糸腺を含有)を用いた反応液についての、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量を示すグラフである。図7において、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μg/mL)を示し、横軸は反応時間(分)を示す。図7に示すように、5齢期5日目カイコ幼虫の後部絹糸腺由来の抽出物を含有する抽出液を用いて調製した無細胞系タンパク質合成用の反応液は、7時間後まで反応が継続し、28 μg/mLのルシフェラーゼが合成されていた。

[0094] 実施例5

*

(抽出用液の組成)

· 20 mM	HEPES-KOH (pH 7. 4)
· 100 mM	酢酸カリウム
· 2 mM	酢酸マグネシウム
· 1 mM	DTT

抽出後、得られた液状物を遠心分離機(himac CR 20B3(日立工機社製))にて、30000×g、10分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離し、再び30000×g、30分間、4°Cの条件にて遠心分離を行った。遠心分離後、上清のみを単離した。脱塩カラム PD-10(アマシャムバイオサイエンス社製)に、20%グリセロールを含む抽出用液を加えカラムを平衡化した後、上清を供給し、上記抽出用液にて溶出することによりゲル通過を行った。ゲル通過後の滤液の画分を、分光光度計(U1 tr o s p e c 3300 pro、アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて、280 nmにおける吸光度が1.0以上の画分を分取して、これに80 μg/mLの外来mRNA

* : カイコ幼虫の後部絹糸腺由来の抽出液の調製
5齢期の4日目に達したカイコ幼虫をサンプリングした。サンプリングしたカイコから、ハサミ、ピンセット、メスを使用して、後部絹糸腺を摘出し、以下の手順に従って後部絹糸腺について抽出を行った。抽出は、まず、5齢期の4日目に達したカイコ幼虫より摘出した後部絹糸腺を液体窒素で凍結し、-80°Cで凍結させた乳棒ですり潰し、下記組成の抽出用液を用いて、抽出を行った。

*

30 μg/mLを添加し、5齢期のカイコ幼虫の後部絹糸腺由来の無細胞系タンパク質合成用抽出液を得た。外来mRNAとしては、ルシフェラーゼをコードするmRNA(ルシフェラーゼコントロールRNA、プロメガ社製)を用いた。熟練者(1人)が上記の調製方法にて抽出液を調製するのにかかった平均時間は、約2時間であった。

[0095] 実験例5

: 実施例5の抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成

40 上記実施例5で得られた抽出液を用いて、下記の組成の反応液を調製し、実験例1で行ったのと同様にしてルシフェラーゼの合成を行った。

〔反応液組成〕

· 50 (v/v) %	抽出液(反応液中における外来mRNA: 40 μg/mL)
· 30 mM	HEPES-KOH (pH 7. 4)
· 100 mM	酢酸カリウム
· 1. 5 mM	酢酸マグネシウム
· 0. 5 mM	DTT
· 10% (v/v) %	グリセロール

25	
0. 5 mM	ATP
0. 5 mM	GTP
0. 25 mM	EGTA
2.5 mM	クレアチニンリン酸
200 μ g/mL	クレアチニナーゼ
40 μ M	アミノ酸(20種)
2 U/ μ L	RNase インヒビター
200 μ g/mL	tRNA

結果、抽出液にPMSFを未添加の場合のタンパク質(ルシフェラーゼ)合成量は、PMSFを添加した場合の50.2%にまで減少していた。

【0096】

【発明の効果】以上の説明で明らかなように、本発明によれば、調製が容易であり、真核生物由来であるため、糖タンパク質の合成も可能な無細胞系タンパク質合成を実現し得る新規な無細胞系タンパク質合成用抽出液、およびその調製方法、ならびに当該抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抽出液の調製方法1～3を簡略化して示すフローチャートである。

【図2】本発明の抽出液の調製方法4を簡略化して示すフローチャートである。

【図3】実施例1の抽出液(カイコ幼虫の後部緑糸腺を含有)を用いた各反応液についての、反応開始より2時間後のルシフェラーゼ合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μ g/mL)を示し、横軸は5齢期カイコ幼虫の生育日数を示す。

26	
----	--

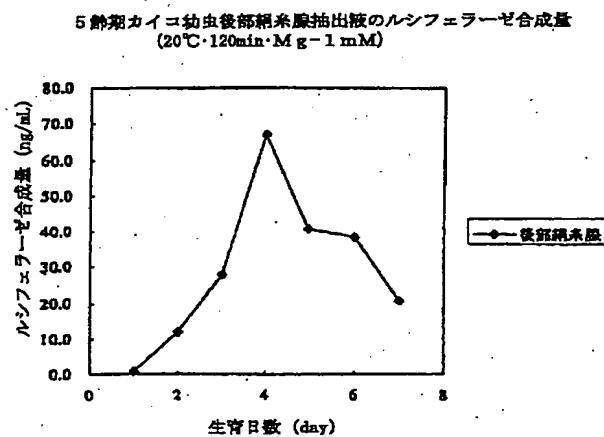
*【図4】実施例2の抽出液(カイコ幼虫の脂肪体を含有)を用いた各反応液についての、反応開始より2時間後のルシフェラーゼ合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μ g/mL)を示し、横軸は5齢期カイコ幼虫の生育日数を示す。

【図5】実施例1の抽出液を用いた各反応液(1日目～7日目の各日のサンプル)についての、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μ g/mL)を示し、横軸は反応時間(分)を示す。

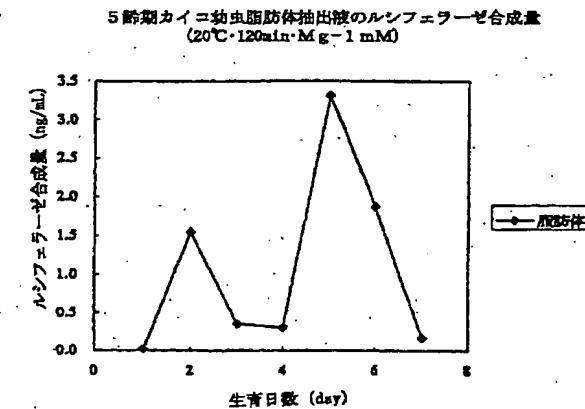
【図6】最適化した組成の反応液についての、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μ g/mL)を示し、横軸は反応時間(分)を示す。

【図7】実施例4の抽出液(カイコ幼虫の後部緑糸腺を含有)を用いた反応液についての、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μ g/mL)を示し、横軸は反応時間(分)を示す。

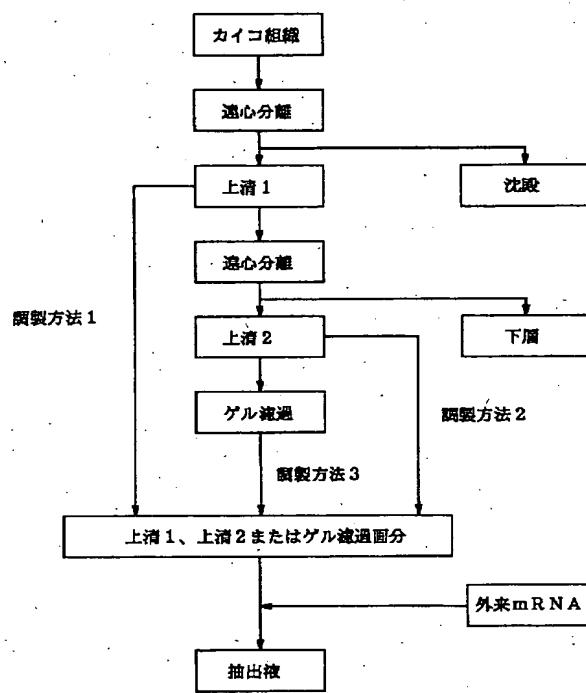
【図3】



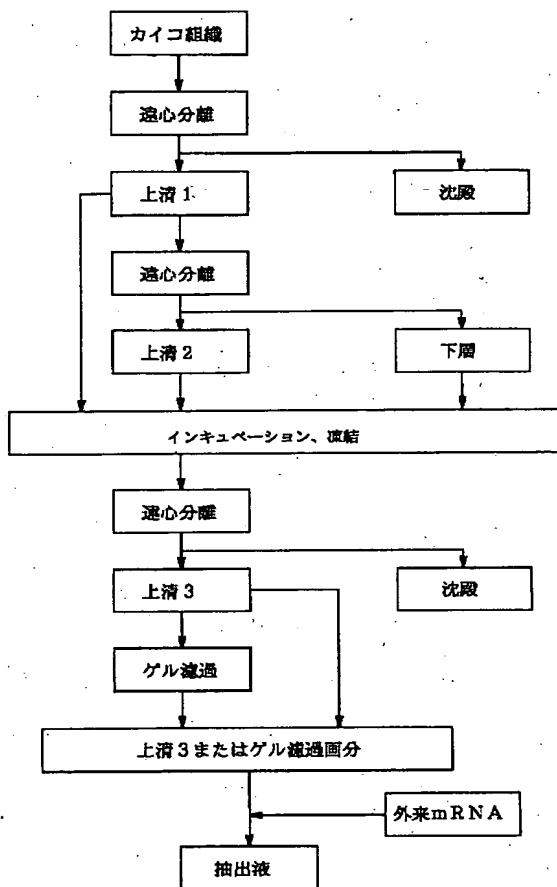
【図4】



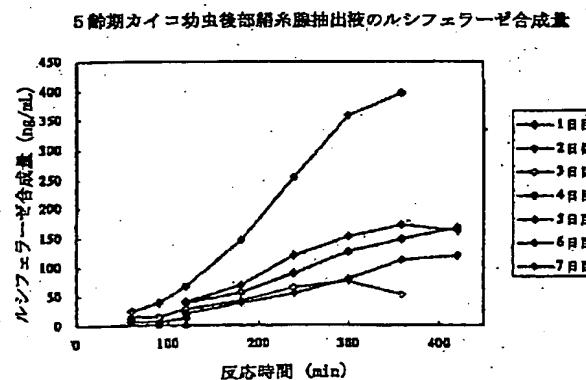
【図1】



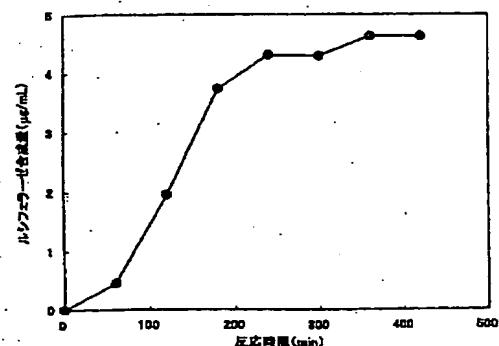
【図2】



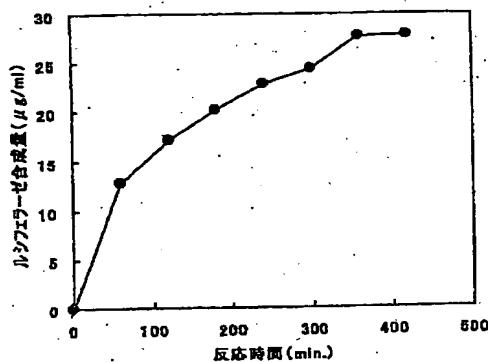
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 白木 聰子
大阪府大阪市福島区大開4-1-186 レ
ンゴー株式会社中央研究所内

(72)発明者 伊東 昌章
大阪府大阪市福島区大開4-1-186 レ
ンゴー株式会社中央研究所内
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA20 BA08
CA12 DA20 GA11 HA20
4B064 AG01 CA19 CA50 CC01 CC24
CD16 CD21 CD30 DA01 DA16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.